

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 37 722.7

Anmeldetag: 17. August 2002

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt/DE

Bezeichnung: Indol- oder Benzimidazolderivate zur Modulation der IKB-Kinase

IPC: C 07 D, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. Februar 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, likely belonging to the President of the German Patent and Trade Mark Office.

Weihmayr

Beschreibung

Indol- oder Benzimidazolderivate zur Modulation der I κ B-Kinase

- 5 Die Erfindung betrifft Indol- oder Benzimidazolderivate, die I κ B-Kinase inhibieren, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung derselben als Arzneimittel.

10 In der Patentanmeldung WO 94/12478 werden unter anderen Indolderivate beschrieben, welche die Blutplättchen-Aggregation inhibieren. In den Patentanmeldungen WO 01/00610 und WO 01/30774 werden Indol- und Benzimidazolderivate beschrieben, die NF κ B modulieren können. NF κ B ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der eine Vielzahl von Gene aktivieren kann, die unter anderen für proinflammatorische Cytokine wie IL-1, IL-2, TNF α oder IL-6 kodieren. NF κ B liegt im Cytosol von Zellen komplexiert mit seinem natürlich vorkommenden Inhibitor I κ B vor. Die Stimulation von Zellen, beispielsweise durch Cytokine, führt zur Phosphorylierung und
15 anschließenden proteolytischen Abbau von I κ B. Dieser proteolytische Abbau führt zur Aktivierung von NF κ B, das anschließend in den Kern der Zelle wandert und dort eine Vielzahl von proinflammatorischen Genen aktiviert.

In Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (bei der Entzündung), Osteoarthritis, Asthma, Herzinfarkt, Alzheimer Erkrankungen, Diabetes Typ II, „inflammatory bowel disease“ oder
20 Atherosklerose ist NF κ B über das normale Maß hinaus aktiviert. Die Hemmung von NF κ B ist auch in der Krebstherapie von Nutzen, da sie dort alleine oder zur Verstärkung der Cytostatika Therapie eingesetzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Arzneimittel wie Glucocorticoide, Salicylate oder Goldsalze, die in der Rheumatherapie eingesetzt werden, an verschiedenen Stellen in die NF κ B aktivierende Signalkette inhibierend eingreifen oder direkt mit der
25 Transkription der Gene interferieren.

Der erste Schritt in der genannten Signalkaskade ist der Abbau von I κ B. Diese Phosphorylierung wird durch die spezifische I κ B-Kinase reguliert. Bisher sind keine Inhibitoren bekannt, die spezifisch I κ B-Kinase inhibieren.

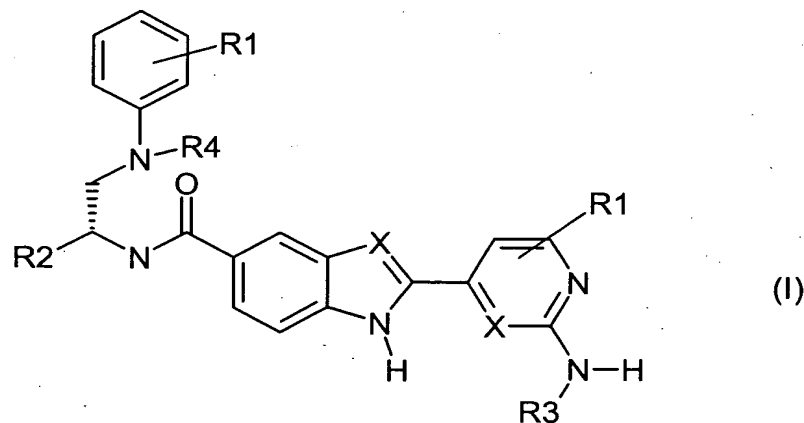
- 30 Nachteil der bekannten Inhibitoren von I κ B-Kinase ist häufig die mangelnde Spezifität der Hemmung für nur eine Klasse von Kinasen. Beispielsweise hemmen die meisten Inhibitoren von I κ B-Kinase mehrere verschiedene Kinasen gleichzeitig, weil die katalytischen Domänen dieser

Kinasen ähnliche Strukturen aufweisen. Demzufolge wirken die Inhibitoren in unerwünschter Weise auf viele Enzyme, auch solche mit vitaler Funktion ein.

In der Patentanmeldung WO 01/30774 wurden bereits Indolderivate beschrieben, die NFκB modulieren können und eine starke inhibitorische Wirkung auf IκB-Kinase aufweisen. Die in WO 01/30774 offenbarten Verbindungen, die in den Beispielen beschrieben werden, zeigen aber auch eine starke hemmende Wirkung auf andere Kinasen wie cAMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase C oder Caseinkinase II. Einige dieser Indolderivate zeigen bei einer Verbesserung der Spezifität jedoch die Verringerung der Inhibition von IκB-Kinase. Ferner ist der erzielbare Blutplasmaspiegel mit den in WO 01/30774 offenbarten Verbindungen nicht ausreichend für eine orale Applikation dieser Derivate.

In dem Bestreben wirksame Verbindungen zur Behandlung von rheumatoider Arthritis (bei der Entzündung), Osteoarthritis, Asthma, Herzinfarkt, Alzheimer Erkrankungen, Krebserkrankungen (Potenzierung von Cytotoxica-Therapien) oder Atherosklerose zu erhalten, wurde nun gefunden, dass die erfindungsgemäßen Indol- und Benzimidazolderivate die obengenannten Nachteile nicht aufweisen. Die erfindungsgemäßen Indol- und Benzimidazolderivate sind starke Inhibitoren der IκB-Kinase, hemmen dabei sehr selektiv Kinasen und weisen einen hohen Blutplasmaspiegel nach oraler Gabe auf.

Die Erfindung betrifft daher die Verbindung der Formel I



und/oder eine stereoisomere Form der Verbindung der Formel I und/oder ein physiologisch verträgliches Salz der Verbindung der Formel I, wobei
X für N-Atom oder CH steht,

- R1 für
1. Wasserstoffatom,
 2. Halogen,
 3. $-(C_1-C_4)$ -Alkyl,
 4. $-CN$,
 5. $-CF_3$,
 6. $-OR^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
 7. $-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,
 8. $-C(O)-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht, oder
 9. $-S(O)_x-R^5$, worin x die ganze Zahl Null, 1 oder 2 bedeutet und R^5 Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl bedeutet, steht,

- R2 für
1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe Pyridazin, Pyrimidin, Pyrazin, Piperazin, Pyrazol, Imidazol, Pyrazolin, 1,3,4-Oxadiazol, Imidazolin, Pyrazolidin, Imidazolidin, Oxazol, Isoxazol, 2-Isoxazolidin, Isoxazolidin, Morpholin, Isothiazol, Thiazol, Isothiazolidin, Tetrazol, Thiomorpholin, Indazol, Thiadiazol, Triazol, Triazon, 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide, Oxadiazolone, Isoxazon, Oxadiazolidindion, Triazol, 3-Hydroxypyrrro-2,4-dion und 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazol steht, und
der Heteroarylrest unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch

- 1.1 $-C(O)-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
- 1.2 $-(C_1-C_4)$ -Alkyl,
- 1.3 $-O-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
- 1.4 $-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,
- 1.5 Halogen oder
- 1.6 Keto-Rest,
2. $-C(O)-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
3. $-C(O)-OR^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht, oder

4. $-C(O)-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,

R3 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,

5

R4 für 1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol, Tetrazol, 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide, Triazolone, Oxadiazolone, Isoxazolone, Oxadiazolidindione, Triazole, 3-Hydroxypyrro-2,4-dione, 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazole, Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Indol, Isoindol, Indazol, Phthalazin, Chinolin, Isochinolin, Chinoxalin, Chinazolin, Cinnolin, -Carbolin und benz-anellierte, cyclopenta-, oder cyclohexa- Derivate dieser Heterocyclen ableiten Heteroaryl steht oder

10

2. einen Arylrest aus der Gruppe Phenyl, Naphthyl, 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, Biphenylyl, 2-Biphenylyl, 3-Biphenylyl und 4-Biphenylyl, Anthryl oder Fluorenyl steht, und

15

der Arylrest unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch $-(C_1-C_5)$ -Alkyl, $-(C_1-C_5)$ -Alkoxy, Halogen, Nitro, Amino, Trifluormethyl, Hydroxy, Hydroxy- (C_1-C_4) -alkyl, Methylendioxy, Ethylendioxy, Formyl, Acetyl, Cyano, Hydroxycarbonyl, Aminocarbonyl oder $-(C_1-C_4)$ -Alkoxycarbonyl.

20

Die Erfindung betrifft ferner Verbindungen der Formel I, wobei

X für N-Atom oder CH steht,

25

R1 wie oben unter 1. bis 9. definiert ist,

R2 für 1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe 1,3,4-Oxadiazol, Oxazol, Thiazol, Isothiazol, Thiadiazol, Imidazol, Triazol, Triazolone, Tetrazol, Isoxazol, 2-Isoxazolidin, Isoxazolidin, 1,2,3,5- Oxadiazolon, Isoxazolon oder Oxadiazolidindion, steht, und der Heteroarylrest unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch

30

1.1 Keto-Rest,

1.2 Halogen oder

1.3 $-(C_1-C_2)$ -Alkyl, oder

2. $-C(O)-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,

5 R³ für Wasserstoffatom, Methyl oder Ethyl steht,

R⁴ für 1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe der ungesättigten, teilweise gesättigten oder vollständig gesättigte Ringe steht, die sich von Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol ableiten, oder

2. Phenyl steht, und Phenyl unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch Halogen, $-OH$, $-(C_1-C_4)$ -Alkyl oder $-(C_1-C_4)$ -Alkoxy.

15

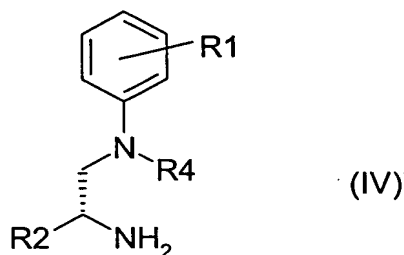
Die Erfindung betrifft ferner die Verbindung 2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamino-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid.

- 20 Unter dem Begriff "Halogen" wird Fluor, Chlor, Brom oder Jod verstanden. Unter dem Begriff " $-(C_1-C_5)$ -Alkyl" oder " $-(C_1-C_5)$ -Alkoxy" werden Kohlenwasserstoffreste verstanden, deren Kohlenstoffkette geradkettig oder verzweigt ist und 1 bis 5 Kohlenstoffatome enthält wie Methyl, Ethyl, Propyl, n-Butyl, Pentyl oder tertiär-Butyl. Unter dem Begriff „Heteroarylrest aus der Gruppe der ungesättigten, teilweise gesättigten oder vollständig gesättigte Ringe, die sich von
- 25 Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol ableiten“ werden beispielsweise Verbindungen verstanden wie Piperazin, Pyrazolin, Imidazolin, Pyrazolidin, Imidazolidin, Tetrahydropyridin, Isoxazolin, Isoxazolidin, Morpholin, Isothiazolin, Isothiazolidin, Tetrahydro-1,4-thiazin oder Piperidin.

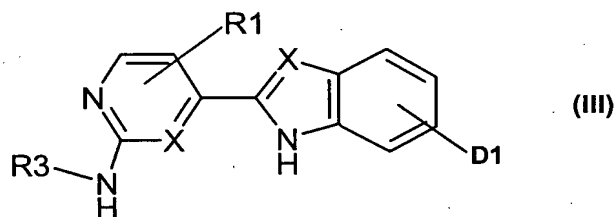
- 30 Die Ausgangsstoffe der chemischen Umsetzungen sind bekannt oder lassen sich nach literaturbekannten Methoden leicht herstellen.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I und/oder einer stereoisomeren Form der Verbindung der Formel I und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes der Verbindung der Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- 5 a) eine Verbindung der Formel IV,



worin R1, R2 und R4 wie in Formel I definiert sind, mit einem Säurechlorid oder einem aktivierten Ester der Verbindung der Formel III,



wobei D1 –COOH bedeutet und R1, X und R3 wie in Formel I definiert sind, in Gegenwart
10 einer Base oder gegebenenfalls eines wasserentziehenden Mittels in Lösung umgesetzt und in eine Verbindung der Formel I überführt,

- b) eine nach Verfahren a) hergestellte Verbindung der Formel I, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in enantiomeren Formen auftritt, durch Salzbildung mit enantiomerenreinen Säuren oder Basen, Chromatographie an chiralen Stationärphasen oder Derivatisierung mittels chiraler enantiomerenreinen Verbindungen wie Aminosäuren, Trennung der somit erhaltenen Diastereomeren, und Abspaltung der chiralen Hilfsgruppen in die reinen Enantiomeren auftrennt, oder

- 20 c) die nach den Verfahren a) oder b) hergestellte Verbindung der Formel I entweder in freier Form isoliert oder im Falle des Vorliegens von sauren oder basischen Gruppen in physiologisch verträgliche Salze umwandelt.

Die Darstellung der Indol- oder Benzimidazolcarbonsäure-Derivate erfolgt nach einer Methode wie sie in Houben-Weyl "Methoden der Org. Chemie", Band E6-2A bzw. E6-2B beschrieben ist. So lassen sich zur Darstellung der Indol- oder Benzimidazolcarbonsäure-Derivate der Formel III bevorzugt Hydrazinobenzoesäuren und Aryl- oder Heteroarylketone, in Gegenwart von

5 Polyphosphorsäure als Lösungsmittel bei 145 °C umsetzen. Die Darstellung der benötigten Hydrazinobenzoesäuren erfolgt nach dem Fachmann geläufigen Methoden z.B. aus den entsprechenden Benzoessäure-anilinen, Aryl- oder Heteroarylketone werden ebenfalls nach dem Fachmann gängigen Methoden z.B. aus den entsprechenden Säurechloriden oder Nitrilen durch Umsetzung mit z.B. Organometall-Verbindungen hergestellt.

10

Zur Kondensation der Verbindungen der Formel IV mit denen der Formel III verwendet man vorteilhafterweise die dem Fachmann an sich wohlbekannten Kupplungsmethoden der Peptidchemie (siehe z.B. Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band 15/1 und 15/2, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974). Als Kondensationsmittel oder Kupplungsreagenzien

15 kommen Verbindungen wie Carbonyldiimidazol, Carbodiimide wie Dicyclohexylcarbodiimid oder Diisopropylcarbodiimid (DIC), das O-((Cyano(ethoxy-carbonyl)-methylen)amino)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TOTU) oder Propylphosphonsäureanhydrid (PPA) in Frage.

20

Die Kondensationen können unter Standardbedingungen durchgeführt werden. Bei der Kondensation ist es in der Regel nötig, dass die vorhandenen, nicht reagierenden Aminogruppen durch reversible Schutzgruppen geschützt werden. Gleiches gilt für nicht an der Reaktion beteiligte Carboxylgruppen, die während der Kondensation bevorzugt als -(C₁-C₆)-Alkylester, Benzylester oder tert.-Butylester vorliegen. Ein Aminogruppen-Schutz erübrigt sich, wenn die Aminogruppen noch in Form von Vorstufen wie Nitrogruppen oder Cyanogruppen vorliegen und

25 erst nach der Kondensation durch Hydrierung gebildet werden. Nach der Kondensation werden die vorhandenen Schutzgruppen in geeigneter Weise abgespalten. Beispielsweise können NO₂-Gruppen (Guanidinoschutz in Aminosäuren), Benzyloxycarbonylgruppen und Benzylgruppen in Benzylestern abhydriert werden. Die Schutzgruppen vom tert.-Butyltyp werden sauer abgespalten, während der 9-Fluorenylmethyloxycarbonylrest durch sekundäre Amine entfernt

30 wird.

35

Die Erfindung betrifft auch Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an mindestens einer Verbindung der Formel I und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes der Verbindung der Formel I und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der Verbindung der

Formel I, zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen

5 Verbindungen zur Prophylaxe und Therapie all solcher Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von I κ B-Kinase beteiligt ist. Dazu gehören beispielsweise chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, rheumatoide Arthritis, oder degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Diabetes Typ II, 10 „inflammatory bowel disease“, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen oder Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen und Periodontalerkrankungen, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels, oder Erkrankungen, die durch eine Überexpression von Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) oder erhöhte Konzentration an TNF α bedingt sind wie 15 Kachexie, Multiple Sklerose, Schädel-Hirn Trauma, Morbus Crohn und Darmgeschwüre, oder Erkrankungen wie Atherosklerose, Stenosen, Ulceration, Alzheimers Erkrankungen, Muskelabbau, Krebserkrankungen (Potenzierung von Cytotoxica-Therapien), Herzinfarkt, Gicht, Sepsis, septischer Schock, endotoxischer Schock, virale Infektionen wie Grippe, Hepatitis, HIV-Infektionen, AIDS, oder durch Adenoviren oder Herpesviren verursachte Erkrankungen, 20 parasitische Infektionen wie Malaria oder Lepra, Pilz- oder Hefeinfektionen, Gehirnhautentzündungen, chronische entzündliche Lungenerkrankungen wie chronische Bronchitis oder Asthma, acute respiratory distress syndrome, akute Synovitis, Tuberkulose, Psoriasis, Diabetes, Behandlung von akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen des Organempfängers gegen das verpflanzte Organ, chronische Graft-versus-Host-Erkrankungen und 25 entzündliche Gefäßerkrankungen. Die genannten Erkrankungen können mit den erfindungsgemäß eingesetzten Verbindungen wesentlich spezifischer und mit einem kleineren Nebenwirkungsspektrum eingesetzt werden, weil im wesentlichen nur I κ B-Kinase gehemmt wird.

30 Die Applikation der erfindungsgemäßen Arzneimittel kann durch orale, inhalative, rektale oder transdermale Applikation oder durch subkutane, intraartikuläre, intraperitoneale oder intravenöse Injektion erfolgen. Bevorzugt ist die orale Applikation.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet, dass man mindestens eine Verbindung der Formel I mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

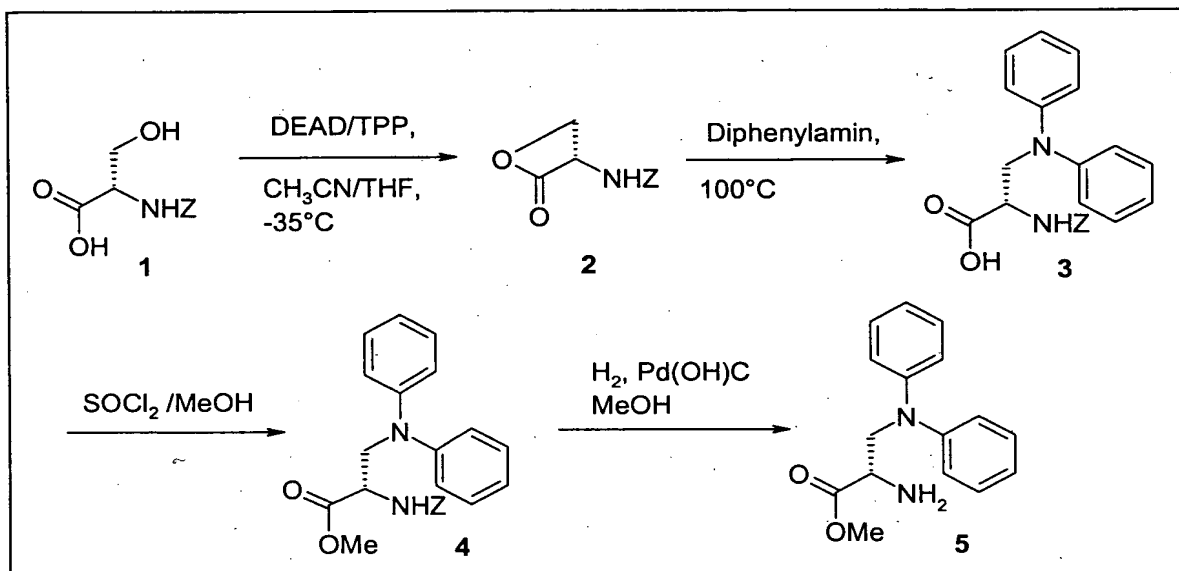
5

Geeignete feste oder galenische Zubereitungsformen sind beispielsweise Granulate, Pulver, Dragees, Tabletten (Mikro)Kapseln, Suppositorien, Sirupe, Säfte, Suspensionen, Emulsionen, Tropfen oder injizierbare Lösungen sowie Präparate mit protrahierter Wirkstoff-Freigabe, bei deren Herstellung übliche Hilfsmittel, wie Trägerstoffe, Spreng-, Binde-, Überzugs-, Quellungs-,
 10 Gleit- oder Schmiermittel, Geschmacksstoffe, Süßungsmittel und Lösungsvermittler, Verwendung finden. Als häufig verwendete Hilfsstoffe seien Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Laktose, Mannit und andere Zucker, Talkum, Milcheiweiß, Gelatine, Stärke, Cellulose und ihre Derivate, tierische und pflanzliche Öle wie Lebertran, Sonnenblumen-, Erdnuß- oder Sesamöl, Polyethylenglykol und Lösungsmittel wie etwa steriles Wasser und ein- oder mehrwertige
 15 Alkohole wie Glycerin, genannt. Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis der erfindungsgemäßen Verbindung der Formel I enthält. Bei festen Dosierungseinheiten wie Tabletten, Kapseln, Dragees oder Suppositorien, kann diese Dosis bis zu etwa 1000 mg, bevorzugt von etwa 50 mg bis 300 mg und bei Injektionslösungen in
 20 Ampullenform bis zu etwa 300 mg, vorzugsweise von etwa 10 mg bis 100 mg, betragen. Für die Behandlung eines erwachsenen, etwa 70 kg schweren Patienten sind je nach Wirksamkeit der Verbindung gemäß Formel I, Tagesdosen von etwa 20 mg bis 1000 mg Wirkstoff, bevorzugt von etwa 100 mg bis 500 mg indiziert. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder
 25 niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit oder aber mehrerer kleinerer Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

Endprodukte werden in der Regel durch massenspektroskopische Methoden (FAB-, ESI-MS)
 30 bestimmt. Temperaturangaben in Grad Celsius, RT bedeutet Raumtemperatur (22 °C bis 26 °C). Verwendete Abkürzungen sind entweder erläutert oder entsprechen den üblichen Konventionen. Nachfolgend ist die Erfindung an Hand von Beispielen näher erläutert.

Herstellungsbeispiele

A.1.) Synthese der Aminosäure ((S)-2-Amino-3-diphenylamino-propionsäure-methyl-ester (5))



5 N-Benzyloxy-carbonyl-L-serin-β-lacton (2)

54,8 g (0,209 mol) Triphenylphosphin wurden in 600 ml Acetonitril suspendiert und unter Ausschluss von Feuchtigkeit auf -35 °C bis -45 °C gekühlt. Bei dieser Temperatur wurde innerhalb von 50 Minuten tropfenweise 36,4 g (0,209 mol) Azodicarbon-säure-diethylester hinzugegeben. Man rührte 15 Minuten bei -35 °C nach. Zu diesem Gemisch tropfte man dann langsam eine Lösung aus 50 g (0,209 mol) N-Benzyloxycarbonyl-L-serin (1) in 500 ml Acetonitril, so dass die Temperatur nicht über -35 °C stieg. Anschließend wurden 12 h bei 5 °C gerührt. Zum Abbruch der Reaktion wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und das Rohprodukt mit Mitteldruckchromatographie an Kieselgel gereinigt. (DCM/ACCN : 25/1) Nach dem Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 20,8 g N-Benzyloxy-carbonyl-L-serin-β-lacton (2); Ausbeute 45 %; (siehe auch Org. Synth. 1991 (70) 1ff.) in feinen Nadeln.

Summenformel C₁₁H₁₁NO₄; M.W. = 221,2; MS (M+H) 222,1; ¹H NMR (DMSO-d₆) 4.30 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.22 (m, 2H), 7.45 (m, 5H), 8.20 (d, J = 9.8 Hz, 1H).

(S)-2-Benzyloxycarbonylamino-3-diphenylamino-propionsäure (3)

5,0 g (22.6 mmol) Serinlacton (2) wurden mit 20g (118,2mmol) Diphenylamin verrührt und 2h auf 100°C erhitzt. Das Rohprodukt wurde durch Mitteldruckchromatographie an Kieselgel gereinigt. (DCM/Methanol : 9/1, anschließend EE/n-Heptan : 4/1) Nach Entfernen des Lösungsmittels erhielt man 3.65 g (Ausbeute 42%) saubere 2-Benzyloxycarbonylamino-3-

diphenylamino-propionsäure (3).

Summenformel $C_{23}H_{22}N_2O_4$; M.W. = 390,44; MS (M+H) 391.2;

1H NMR (DMSO- d_6) 3.85 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.3 (m, 1H), 4.9 (m, 2H), 6.9 (m, 5H), 7.25 (m, 10H).

(S)-2-Benzoyloxycarbonylamino-3-diphenylamino-propionsäure-methyl-ester (4)

Zu 75 ml Methanol wurden bei $-5^\circ C$ 6,5 ml (89,1 mmol) Thionylchlorid getropft und 15 min gerührt. Anschließend wurde 3,6 g (9,22 mmol) 2-Benzoyloxycarbonylamino-3-diphenylamino-propionsäure (3) in 75 ml Methanol gelöst zugegeben und weitere 3 Stunden (h) bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Evaporierung der Lösungsmittel wurde der Rückstand in Essigester aufgenommen und mit Natriumcarbonat Lösung extrahiert. Die Reinigung mittels Flash-Chromatographie (n-Heptan/Essigester 7:3) lieferte 2,76 g (50% Ausbeute) von 2-Benzoyloxycarbonylamino-3-diphenylamino-propionsäure-methyl-ester (4).

Summenformel $C_{24}H_{24}N_2O_4$; M.W. = 404,47; MS (M+H) 405.2;

1H NMR (DMSO- d_6) 3.58 (s, 3H), 3.95 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.4 (m, 1H), 4.95 (m, 2H), 6.9 (m, 6H), 7.3 (m, 9H), 7.85 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H).

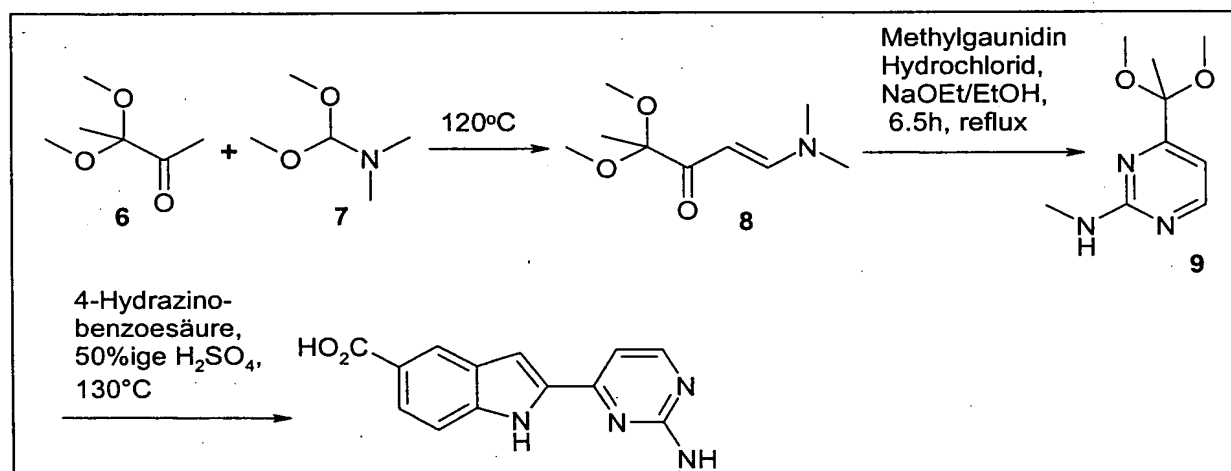
(S)-2-Amino-3-diphenylamino-propionsäure-methyl-ester (5)

Zur Abspaltung der Z-Schutzgruppe löste man 2,7 g (6,68 mmol) des Z-geschützte Derivates (4) in 500 ml Methanol und unter Stickstoff Schutzatmosphäre wurden 100 mg Katalysator (10% Pd(OH) $_2$ -C) zugeführt. Anschließend wurde das Inertgas mit einen großen Überschuss Wasserstoff verdrängt und 2 h in der Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Zum Abbruch der Reaktion wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat eingengt. Man erhielt 1,65 g (Ausbeute: 91%) 2-Amino-3-diphenylamino-propionsäure-methyl-ester (5).

Summenformel $C_{16}H_{18}N_2O_2$; M.W. = 270,32; MS (M+H) 271.2;

1H NMR (DMSO- d_6) 3.45 (s, 3H), 3.58 (m, 1H), 3.8 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 6.9 (m, 6H), 7.3 (m, 4H).

A.2.) Synthese des heterozyklischen Grundkörpers (2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure (10))



1-Dimethylamino-4,4-dimethoxy-pent-1-en-3-on (8)

100 g (0.76 mol) 3,3-Dimethoxy-2-butanon wurden mit 90,2 g N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal (0.76 mol) bei 120°C 48 h gerührt. Das bei der Reaktion entstandene Methanol wurde kontinuierlich von der Reaktionslösung durch Destillation entfernt. Beim Erkalten der Lösung trat spontane Kristallisation ein, welche durch Zugabe von wenig Heptan zur Vollständigkeit gebracht wurde. Man erhielt so 128,24 g Rohprodukt **8** (Ausbeute 90%), welches ohne weitere Reinigung umgesetzt wurde.

Summenformel $C_9H_{17}NO_3$; M.W. = 187.24; MS (M+H) 188.2;

1H NMR (DMSO- d_6) 1.22 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 3.10 (s, 9H), 5.39 (d, J = 15 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 15 Hz, 1H).

[4-(1,1-Dimethoxy-ethyl)-pyrimidin-2-yl]-methyl-amin (9)

1,22 g (53 mmol) Natrium wurden in 100 ml absoluten Ethanol gelöst. Dazu wurde unter Rühren 5,8 g (53 mmol) Methylguanidinhydrochlorid und 10 g (53 mmol) 1-Dimethylamino-4,4-dimethoxy-pent-1-en-3-on (**8**) gegeben und 4 h auf Siedehitze erwärmt. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Ethanol evaporiert. Das so erhaltene Produkt **9** wurde ohne weitere Reinigung für die Folgereaktion eingesetzt. Ausbeute 11.5 g (58 mmol, quantitativ)

Summenformel $C_9H_{15}N_3O_2$; M.W. = 197.24; MS (M+H) 198.2;

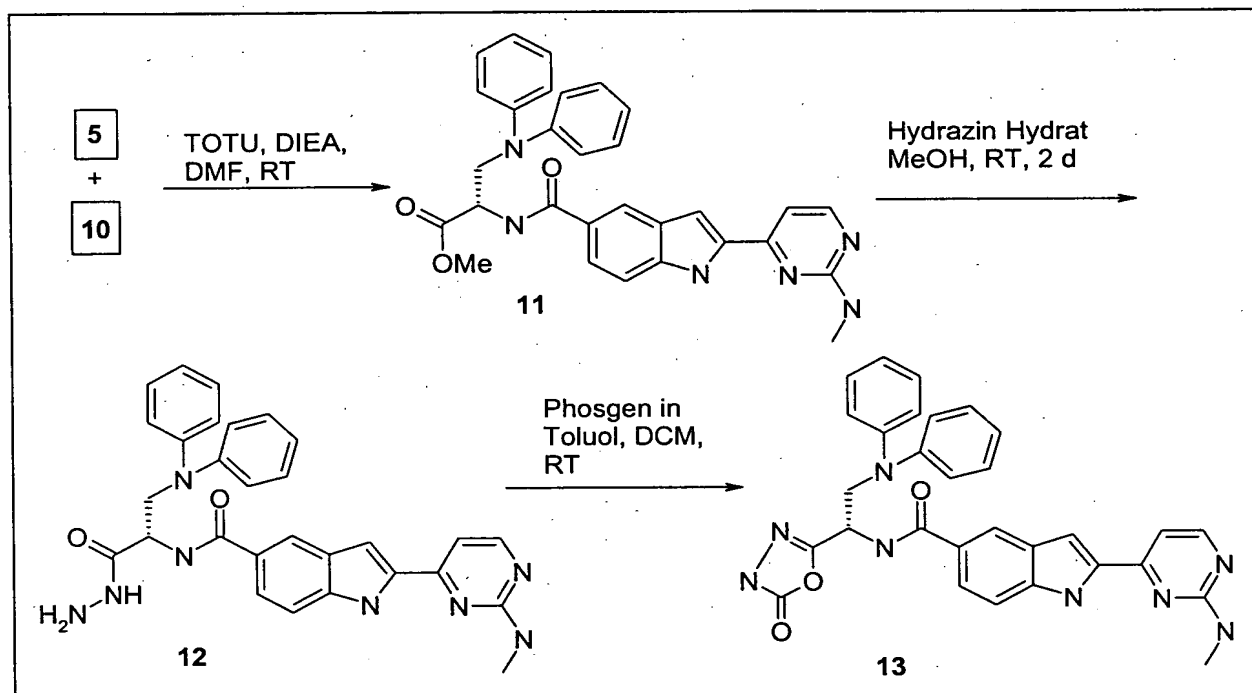
1H NMR (DMSO- d_6) 1.45 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 3.10 (s, 6H), 6.75 (d, J = 3 Hz, 1H), 7.0 – 7.1 (s(b), 1H), 8.30 (d, J = 3 Hz, 1H).

2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure (10)

In 150 ml 50%iger Schwefelsäure wurden bei Raumtemperatur 5 g (25 mmol) [4-(1,1-Dimethoxy-ethyl)-pyrimidin-2-yl]-methyl-amin (**9**) und 3.85 g 4-Hydrazinobenzoesäure unter Rühren gegeben und 4 h auf 130°C erhitzt. Das bei der Reaktion entstandene Methanol wurde kontinuierlich von der Reaktionslösung durch Destillation entfernt. Nach Abkühlen auf 10°C wurde die Reaktionsmischung auf 200 ml Eis gegossen und mit konzentrierter Natronlauge ein pH-Wert von etwa 5,5 eingestellt. Der dabei entstandene Niederschlag von Natriumsulfat und Produktgemisch wurde abfiltriert und der Filter-Rückstand wurde mehrmals mit Methanol extrahiert. Die vereinigten Methanol Extrakte wurde eingeeengt und das Produkt durch Flash-Chromatographie (DCM/Methanol 9:1) gereinigt. Ausbeute: 0,76 g (11%) Summenformel

$C_{14}H_{13}N_4O_2$; M.W. = 268.28; MS (M+H) 405.2; 1H NMR (DMSO- d_6) 2.95 (s, 3H), 6.90 – 7.10 (s(b), 1H), 7.18 (d, J = 3 Hz, 1H), 7.4 (s, 1H), 7.58 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.80 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 3 Hz, 1H), 11.85 (s, 1H), 12.40 – 12.60 (s(b), 1H).

A.3.) Zusammenführung der Bausteine und Synthese von (2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamino-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid (13))



3-Diphenylamino-2-[[2-(2-methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonyl]- (S)-amino]-propionsäure (11)

5,0 g (18,64 mmol) 2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure (10)

wurden in 1,2 l DMF gelöst und nacheinander mit 7,9 g (24,08 mmol) TOTU und 7,9 ml (46,45 mmol) Ethyldiisopropylamin versetzt. Man rührte 20 min. bei 5°C und gab zu der Lösung 0,73 g (3,28 mmol) (S)-2-Benzoyloxycarbonylamino-3-diphenylamino-propionsäure (5) hinzu. Nach 15 h

Rühren engte man unter vermindertem Druck ein, nahm den Rückstand in n-Butanol auf und extrahierte die organische Phase zur Abtrennung von Nebenprodukten mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung. Nach dem Trocknen mit MgSO_4 und Einengen der organische Phase wurde der Methylester der Titelverbindung durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (DCM:MeOH = 19:1) isoliert. Ausbeute: 4.3 g (98%)

Summenformel $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_3$; M.W. = 520,22; MS (M+H) 521,3;

^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 2.95 (s(b), 3H), 3.60 (s, 3H), 4.19 – 4.58 (m, 2H), 4.85 (q, 1H), 6.90 – 7.10 (m,

7H), 7.18 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 7.25 – 7.40 (m, 5H), 7.50 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.35 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J = 3.75$ Hz, 1H), 11.85 (s, 1H).

2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure ((S)-2-diphenylamin-1- hydrazin-
5 carbonyl-ethyl)-amid (**12**)

1,0 g (1,92 mmol) 3-Diphenylamin-2-[[2-(2-methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonyl]- (S)-
amino]- propionsäure (**11**) wurde in 10 ml Methanol gelöst, mit 0,48 g (9,95 mmol)

Hydrazinhydrat versetzt und 15 h bei Raumtemperatur gerührt. Der Niederschlag des Produktes
(0.3 g) wurde durch Filtration von der Mutterlauge getrennt. Aus der eingeeengten Mutterlauge

10 wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (DCM:MeOH= 19:1) weiteres Hydrazon **12**
(0.1g) isoliert. Ausbeute: 0.4 g (40%)

Summenformel $C_{29}H_{28}N_8O_2$; M.W. = 520,6; MS (M+H) 521,4;

1H NMR (DMSO- d_6) 2.95 (s(b), 3H), 4.02 – 4.58 (m, 2H), 4.4 (s, 2H), 4.85 (q, 1H), 6.90 – 7.10 (m, 7H),
7.18 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 7.20 – 7.45 (m, 5H), 7.50 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.99
15 (s, 1H), 8.25 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 8.35 (s(b), 1H), 9.30 (s, 1H), 11.70 (s, 1H).

2-(2-Methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamin-1-(5-oxo- 4,5-
dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid (**13**)

200 mg (0.384 mmol) 2-(2-Methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure ((S)-2-

20 diphenylamin-1-hydrazincarbonyl-ethyl)-amid (**12**) wurden in 20 ml Methylenchlorid suspensiert
und bei 0°C wurde eine 20%ige Phosgen Lösung in Toluol (0.398 mmol) unter Rühren zugetropft.

Es wurde weitere 15 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel eingeeengt. Das

Oxadiazolon **13** wurde anschließend durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (DCM:MeOH= 9
:1) isoliert. Ausbeute: 160 mg (76%)

25 Summenformel $C_{30}H_{26}N_8O_3$; M.W. = 546,6; MS (M+H) 547.3;

1H NMR (DMSO- d_6) 2.95 (s(b), 3H), 4.02 – 4.58 (m, 2H), 4.85 (q, 1H), 6.90 – 7.10 (m, 7H), 7.15 (d, $J =$
3 Hz, 1H), 7.20 – 7.40 (m, 6H), 7.52 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.92
(d, $J = 3$ Hz, 1H), 11.78 (s, 1H), 12.15 – 12.40 (s(b), 1H).

Pharmakologische Beispiele

I κ B-Kinase ELISA:

Die Aktivität der I κ B-Kinase wurde mit einem ELISA, bestehend aus einem biotiniliertem Substratpeptid, welches die Aminosäuresequenz im Protein I κ B von Serine 32 bis 36 enthält, und einem spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper (z.B. von New England Biolabs, Beverly, MA, USA, Kat.: 9240), der nur an die phosphorylierte Form des Peptids I κ B bindet, bestimmt. Dieser Komplex wurde an einer antikörperbindenden Platte (Protein A beschichtet) immobilisiert und mit einem Konjugat aus einem biotinbindendem Protein und HRP (z.B. Streptavidin-HRP) detektiert. Die Aktivität wurde an Hand einer Standardkurve mit Substratphosphopeptid quantifiziert.

10 Durchführung:

Zur Gewinnung des Kinasekomplexes wurden 10 ml HeLa S3-Zelleextrakt S100 mit 40 ml 50mM HEPES, pH 7,5, verdünnt, auf 40% Ammoniumsulfat gebracht und auf Eis 30 Minuten inkubiert. Das präzipitierte Pellet wurde in 5 ml SEC Puffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM DTT, 0,5 mM EDTA, 10 mM 2-Glyzerophosphat) gelöst, bei 20,000 x g für 15 Minuten zentrifugiert und durch einen 0,22 μ m Filter filtriert. Die Probe wurde auf eine 320 ml Superose-6 FPLC Säule (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) aufgetragen, die mit SEC Puffer äquilibriert war und mit einer Flußrate von 2 ml/min bei 4 °C betrieben wurde. Die Fraktionen, die bei der Laufzeit des 670 kDa Molekulargewichtstandards lagen, wurden für die Aktivierung vereinigt. Die Aktivierung wurde durch eine 45-minütige Inkubation mit 100 nM MEKK1 Δ , 250 μ M MgATP, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 10 mM 2-Glyzerophosphat, 2,5 μ M Microcystin-LR bei 37 °C erreicht. Das aktivierte Enzym wurde bei -80 °C gelagert.

Die in DMSO gelösten Testsubstanzen (2 μ l) wurden 30 Minuten bei 25°C mit 43 μ l aktiviertem Enzym (1:25 verdünnt in Reaktionspuffer 50 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 10 mM β -Glycerophosphat, 2,5 μ M Microcystin-LR) vorinkubiert. Dann wurden 5 μ l Substratpeptid (Biotin-(CH₂)₆-DRHDSGLDSMKD-CONH₂) (200 μ M) dazugegeben, eine Stunde inkubiert und mit 150 μ l 50 mM HEPES pH 7,5, 0.1% BSA, 50 mM EDTA, Antikörper [1:200] abgestoppt. 100 μ l des abgestoppten Reaktionsgemisches bzw. einer Standardphosphopeptidverdünnungsreihe (Biotin-(CH₂)₆-DRHDS[PO₃]GLDSMKD-CONH₂) wurden dann in eine Protein-A Platte (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) überführt und 2 Stunden unter Schütteln inkubiert. Nach 3 Waschschritten mit PBS, wurden 100 μ l 0,5 μ g/ml Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) (verdünnt in 50 mM HEPES/ 0,1% BSA) für 30 Minuten hinzugegeben. Nach 5 Waschschritten mit PBS, wurden 100 μ l TMB-Substrat (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) hinzugegeben und die Farbentwicklung durch Zugabe von 100 μ l 0,18 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Absorption

wurde bei 450 nm gemessen. Die Standardkurve wurde durch lineare Regression entsprechend einer 4-Parameter Dosis-Wirkungsbeziehung erzeugt. An Hand dieser Standardkurve wurde die Enzymaktivität bzw. deren Inhibition durch die Testsubstanzen quantifiziert.

- 5 Die IC₅₀ für 2-(2-Methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamin-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid betrug 0,050 µM.

10 Blutplasmaspiegel von 2-(2-Methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamin-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid

Die Verbindung 2-(2-Methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamin-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid, im folgenden Verbindung 13 genannt, wurde männlichen C57/BL6-Mäusen verabreicht. Dazu wurden jeweils etwa 25 mg der
15 Verbindung 1 pro kg Körpergewicht der Mäuse nassgemahlen in 0,5 % Hydroxyethylcellulose (HEC) als Suspension oral (über Schlundsonde) gegeben. Das Ziehen der Blutproben erfolgte nach 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 und 8 Stunden (zu jedem der genannten Zeitpunkte wurde Tötungsblut von jeweils 2 Tieren entnommen). Die Blutproben wurden in Heparin-Plasma umgewandelt. Die Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

20

Analytik:

Die Plasmaproben wurden aufgetaut. Anschließend wurden die für die Analytik störenden Plasmaproteine mittels Acetonitril ausgefällt.

25 Aufarbeitung: 50 µl Plasma + 20 µl interner Standard (5µg/ml) + 50 µl Puffer (2 mMol Ammoniumformiatlösung, pH 2,6/Acetonitril, 40:60, v/v) wurden etwa 10 sec auf einem Whirlmixer gemischt. Anschließend wurde 150 µl Acetonitril zugefügt und erneut etwa 10 sec gemischt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (Hettich, EBA 12, etwa 12000 Umdrehungen pro Minute). Der Überstand (etwa 200 µl) wurde in Glasgefäße transferiert. 70 µl des Überstandes wurden injiziert.

30 Aus dem jeweiligen Überstand wurde der Plasmaspiegelgehalt der Verbindung 13 mittels LC-MS/MS nach der folgenden Methode bestimmt:

HPLC-System: Agilent 1100

Software: Analyst

Säule: 125x4mm Nucleosil 120 5 C18 (Machery&Nagel)

Säulenlänge: 125 mm

Detektion: LC-MS/MS

MS-Gerät: PE – Sciex API 365 (Triple Quadrupole Massespektrometer)

Software: MacQuan Software (PE-Sciex)

5 Detektionsart: MS/MS (MRM)

Flußrate: 0,5 mL/min

Injektionsvolumen: 70 µl

Interner Standard: SK-7 in Acetonitril

Mobile Phase: Acetonitril/2 mMol Ammoniumformiatlösung, pH 2,6 (70:30, v/v)

10 Retentionszeiten (Rt):

Interner Standard: 4,4 min

Verbindung 1: 3,9 min

Die untere Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,01 µg/mL.

15 Ergebnisse:

Der Plasmaspiegel der Verbindung 13 betrug maximal 4,3 µg/mL. Die Exposition gemessen als AUC = Area under the curve betrug 5,4 µg/mLxh..

20 Proteintyrosinkinase

Als Beispiele für die Spezifität der gefundenen IκB-Kinase-Inhibitoren wurde der IC₅₀-Wert bei der Kinase-Enzym Proteintyrosinkinase bestimmt.

Die Proteintyrosinkinase Aktivität wurde mit dem entsprechenden Testkit von Upstate

Biotechnology gemäß der Vorschrift des Hersteller bei einer ATP-Konzentration von 50 µM

25 bestimmt. Abweichend wurden statt Phosphocellulosefilter Multi-Screen-Platten (Millipore;

Phosphocellulose MS-PH, Kat. MAPHNOB10, oder Durapore PVDF, Kat. MADVNOB 50 mit dem entsprechenden Absaugsystem verwendet. Als Testkit-Substrat wurde Poly (Glu, Tyr 4:1) (Sigma

Kat. P0275) Testkonzentration 1 mg/ml, eingesetzt. Die Platten wurden anschließend in einem Wallac MicroBeta Szintillationszähler vermessen. Es wurde jeweils 100 µM der Testsubstanz

30 verwendet.

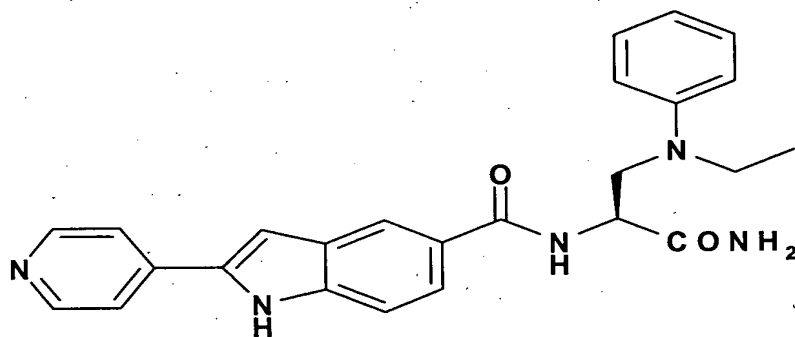
Die Testsubstanz wurde in Doppelbestimmung getestet. Die IC₅₀-Berechnungen wurden mit dem Softwarepaket GraFit 3.0 durchgeführt.

Die IC₅₀ für 2-(2-Methylamin-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamin-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid (Verbindung 13) betrug im Proteintyrosinkinaseassay 82,5 µM.

5

Vergleichsversuch:

Die Verbindung



- 10 wurde wie in WO 01/30774 beschrieben hergestellt und wird im folgenden als Vergleichsverbindung bezeichnet. Die Vergleichsverbindung wurde männlichen NMRI-Mäusen verabreicht. Dazu wurden jeweils etwa 50 mg der Vergleichsverbindung pro kg Körpergewicht der Mäuse in 0,5 % HEC als Suspension oral (über Schlundsonde) gegeben. Das Ziehen der Blutproben erfolgte nach 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 und 8 Stunden (zu jedem der genannten
- 15 Zeitpunkte wurde Tötungsblut von jeweils 2 Tieren entnommen). Die Blutproben wurden in Heparin-Plasma umgewandelt. Die Plasmaproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Analytik: Die Analytik wurde mit HPLC/UV durchgeführt.

- 20 Aufarbeitung: 50 µl Plasma + 20 µl interner Standard (5µg/ml) + 50 µl Puffer (1% Ameisensäure/Acetonitril, 40:60, v/v) wurden etwa 10 sec auf einem Whirlmixer gemischt. Anschließend wurde 150 µl Acetonitril zugefügt und erneut etwa 10 sec gemischt. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (Hettich, EBA 12, etwa 12000 Umdrehungen pro min). Der Überstand (etwa 200 µl) wurde in Glasgefäße transferiert. 100 µl des Überstandes wurden
- 25 injiziert.

Aus dem jeweiligen Überstand wurde der Plasmaspiegelgehalt der Vergleichsverbindung mittels HPLC/UV nach der folgenden Methode bestimmt:

HPLC-System: Gynkoteck P580 HPG-Pumpe + Gilson Abimed XL-231 Autosampler

Software: Mass-chrom

Säule: 125x4mm Protosil 120 3 ODS AQ 3 (Fa. Bischoff)

5 Säulenlänge: 125 mm

Detektion: LC-MS/MS

MS-Gerät: PE – Sciex API 365 (Triple Quadrupole Massespektrometer)

Software: MacQuan Software (PE-Sciex)

Detektionsart: MS/MS (MRM)

10 Flußrate: 0,5 mL/min

Injektionsvolumen: 100 µl

Interner Standard: SK-7 (Aventis-Verbindung) in Acetonitril

Mobile Phase: Acetonitril/2 mMol Ammoniumformiatlösung, pH 2,6 (70:30, v/v)

Retentionszeiten (Rt):

15 Interner Standard: 4 min

Vergleichsverbindung: 1,5 min

Die untere Nachweisgrenze mit 0,01 µg/mL war identisch zu der mittels LC-MS/MS im Beispiel mit der Verbindung 13.

20

Ergebnisse: Der Plasmaspiegel der Vergleichsverbindung betrug maximal 1,5 µg/mL. Die Exposition gemessen als AUC = Area under the curve betrug 1,7 µg/mLxh.

25

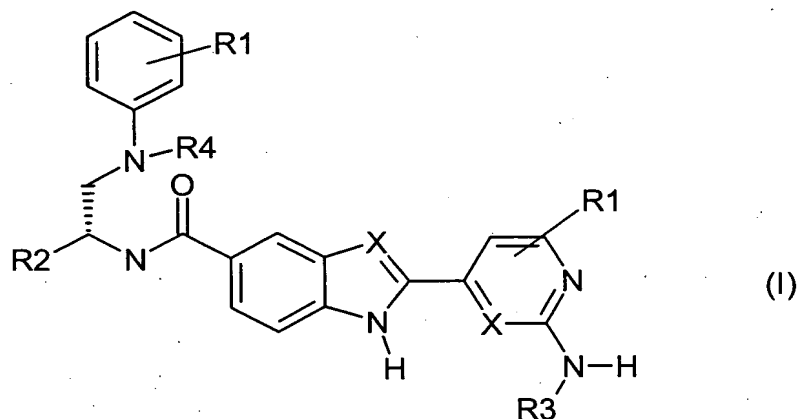
Im Vergleich zum Beispiel mit der Verbindung 13 war der maximale Blutplasmaspiegel etwa 30 % niedriger als im Vergleichsversuch, obwohl die Vergleichsverbindung mit 50 mg/kg doppelt so hoch dosiert wurde wie bei der Verbindung 13. Das gleiche Ergebnis zeigen auch die ermittelten AUC-Werte für die Vergleichsverbindung.

30

Der IC₅₀ für die Vergleichsverbindung betrug im oben beschriebenen Proteintyrosinkinaseassay 46,35 µM. Daher ist der IC₅₀ deutlich besser als für die Verbindung 13.

Noch deutlicher wird die Verbesserung der Spezifität in Bezug auf die IκB-Kinase, wenn man das Verhältnis der IC₅₀ Werte von Proteintyrosinkinase zu IκB-Kinase vergleicht. Dieser Quotient beträgt für die Verbindung 13 1650 (82,5/0,05) und für die Vergleichsverbindung 46,35 (46,35/1,0 ; gemäß den Daten aus WO 01/30774).

1. Verbindung der Formel I



und/oder eine stereoisomere Form der Verbindung der Formel I und/oder ein physiologisch verträgliches Salz der Verbindung der Formel I, wobei X für N-Atom oder CH steht,

- R1 für
1. Wasserstoffatom,
 2. Halogen,
 3. -(C₁-C₄)-Alkyl,
 4. -CN,
 5. -CF₃,
 6. -OR⁵, worin R⁵ für Wasserstoffatom oder -(C₁-C₄)-Alkyl steht,
 7. -N(R⁵)-R⁶, worin R⁵ und R⁶ unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder -(C₁-C₄)-Alkyl stehen,
 8. -C(O)-R⁵, worin R⁵ für Wasserstoffatom oder -(C₁-C₄)-Alkyl steht, oder
 9. -S(O)_x-R⁵, worin x die ganze Zahl Null, 1 oder 2 bedeutet und R⁵ Wasserstoffatom oder -(C₁-C₄)-Alkyl bedeutet, steht,

- R2 für
1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe Pyridazin, Pyrimidin, Pyrazin, Piperazin, Pyrazol, Imidazol, Pyrazolin, 1,3,4-Oxadiazol, Imidazolin, Pyrazolidin, Imidazolidin, Oxazol, Isoxazol, 2-Isoxazolidin, Isoxazolidin, Morpholin, Isothiazol, Thiazol, Isothiazolidin, Tetrazol, Thiomorpholin, Indazol, Thiadiazol, Triazol, Triazolon, 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide,

Oxadiazolone, Isoxazolone, Oxadiazolidindione, Triazol, 3-Hydroxypyrrro-2,4-dione und 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazol steht, und der Heteroarylrest unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch

- 1.1 $-C(O)-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
- 1.2 $-(C_1-C_4)$ -Alkyl,
- 1.3 $-O-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
- 1.4 $-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,
- 1.5 Halogen oder
- 1.6 Keto-Rest,

2. $-C(O)-R^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,
3. $-C(O)-OR^5$, worin R^5 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht, oder
4. $-C(O)-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,

R^3 für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl steht,

- R^4 für
1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol, Tetrazol, 1,2,3,5-Oxathiadiazol-2-Oxide, Triazolone, Oxadiazolone, Isoxazolone, Oxadiazolidindione, Triazole, 3-Hydroxypyrrro-2,4-dione, 5-Oxo-1,2,4-Thiadiazole, Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Indol, Isoindol, Indazol, Phthalazin, Chinolin, Isochinolin, Chinoxalin, Chinazolin, Cinnolin, -Carbolin und benz-anellierte, cyclopenta-, oder cyclohexa- Derivate dieser Heterocyclen ableiten Heteroaryl steht oder
 2. einen Arylrest aus der Gruppe Phenyl, Naphthyl, 1-Naphthyl, 2-Naphthyl, Biphenyl, 2-Biphenyl, 3-Biphenyl und 4-Biphenyl, Anthryl oder Fluorenyl steht, und
- der Arylrest unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch $-(C_1-C_5)$ -Alkyl, $-(C_1-C_5)$ -Alkoxy, Halogen, Nitro, Amino, Trifluormethyl, Hydroxy, Hydroxy- $-(C_1-C_4)$ -alkyl,

Methylendioxy, Ethylendioxy, Formyl, Acetyl, Cyano, Hydroxycarbonyl, Aminocarbonyl oder $-(C_1-C_4)$ -Alkoxycarbonyl.

2. Verbindung der Formel I gemäß Anspruch 1, wobei

5 X für N-Atom oder CH steht,

R1 wie in Anspruch 1 für R1 unter 1. bis 9. definiert ist,

10 R2 für 1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe 1,3,4-Oxadiazol, Oxazol, Thiazol, Isothiazol, Thiadiazol, Imidazol, Triazol, Triazolon, Tetrazol, Isoxazol, 2-Isoxazolidin, Isoxazolidin, 1,2,3,5-Oxadiazolon, Isoxazolon oder Oxadiazolidindion, steht, und der Heteroarylrest unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch

1.1 Keto-Rest,

15 1.2 Halogen oder

1.3 $-(C_1-C_2)$ -Alkyl oder

2. $-C(O)-N(R^5)-R^6$, worin R^5 und R^6 unabhängig voneinander für Wasserstoffatom oder $-(C_1-C_4)$ -Alkyl stehen,

20 R3 für Wasserstoffatom, Methyl oder Ethyl steht,

25 R4 für 1. einen Heteroarylrest aus der Gruppe der ungesättigten, teilweise gesättigten oder vollständig gesättigte Ringe steht, die sich von Pyridin, Pyrazin, Pyrimidin, Pyridazin, Pyrrol, Furan, Thiophen, Imidazol, Pyrazol, Oxazol, Isoxazol, Thiazol, Isothiazol ableiten, oder

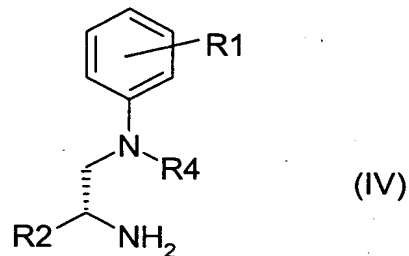
2. Phenyl steht, und Phenyl unsubstituiert ist oder ein-, zwei- oder dreifach unabhängig voneinander substituiert ist durch Halogen, -OH, $-(C_1-C_4)$ -Alkyl oder $-(C_1-C_4)$ -Alkoxy.

30 3. Verbindung der Formel I gemäß der Ansprüche 1 oder 2, wobei die Verbindung der Formel I 2-(2-Methylamino-pyrimidin-4-yl)-1H-indol-5-carbonsäure [(S)-2-diphenylamino-1-(5-oxo-4,5-dihydro-[1,3,4]oxadiazol-2-yl)-ethyl]-amid ist.

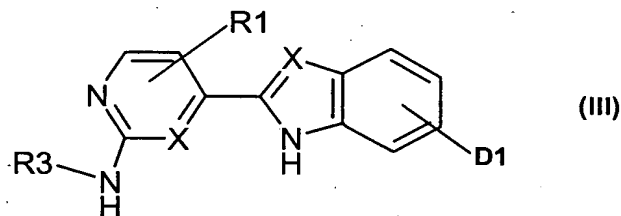
4. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I gemäß einem oder mehreren

der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man

- a) eine Verbindung der Formel IV,



worin R1, R2 und R4 wie in Formel I definiert sind, mit einem Säurechlorid oder einem aktivierten Ester der Verbindung der Formel III,



wobei D1 -COOH bedeutet und R1, X und R3 wie in Formel I definiert sind, in Gegenwart einer Base oder gegebenenfalls eines wasserentziehenden Mittels in Lösung umgesetzt und in eine Verbindung der Formel I überführt,

- b) eine nach Verfahren a) hergestellte Verbindung der Formel I, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in enantiomeren Formen auftritt, durch Salzbildung mit enantiomerenreinen Säuren oder Basen, Chromatographie an chiralen Stationärphasen oder Derivatisierung mittels chiraler enantiomerenreinen Verbindungen wie Aminosäuren, Trennung der somit erhaltenen Diastereomeren, und Abspaltung der chiralen Hilfsgruppen in die reinen Enantiomeren auftrennt, oder
- c) die nach den Verfahren a) oder b) hergestellte Verbindung der Formel I entweder in freier Form isoliert oder im Falle des Vorliegens von sauren oder basischen Gruppen in physiologisch verträgliche Salze umwandelt.

5. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen wirksamen Gehalt an mindestens einer Verbindung der Formel I und/oder eines physiologisch verträglichen Salzes der

Verbindung der Formel I und/oder eine gegebenenfalls stereoisomere Form der Verbindung der Formel I, zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Trägerstoff, Zusatzstoff und/oder anderen Wirk- und Hilfsstoffen.

5

6. Verwendung der Verbindung der Formel I gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prophylaxe und Therapie all solcher Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von I κ B-Kinase beteiligt ist.

10

7. Verwendung gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkrankungen chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, rheumatoide Arthritis, oder degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Diabetes Typ II, „inflammatory bowel disease“, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen oder Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen und Periodontalerkrankungen, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels, oder Erkrankungen, die durch eine Überexpression von Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) oder erhöhte Konzentration an TNF α bedingt sind wie Kachexie, Multiple Sklerose, Schädel-Hirn Trauma, Morbus Crohn und Darmgeschwüre, oder Erkrankungen wie Atherosklerose, Stenosen, Ulceration, Alzheimers Erkrankungen, Muskelabbau, Krebserkrankungen, Herzinfarkt, Gicht, Sepsis, septischer Schock, endotoxischer Schock, virale Infektionen wie Grippe, Hepatitis, HIV-Infektionen, AIDS, oder durch Adenoviren oder Herpesviren verursachte Erkrankungen, parasitische Infektionen wie Malaria oder Lepra, Pilz- oder Hefeinfektionen, Gehirnhautentzündungen, chronische entzündliche Lungenerkrankungen wie chronische Bronchitis oder Asthma, acute respiratory distress syndrome, akute Synovitis, Tuberkulose, Psoriasis, Diabetes, Behandlung von akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen des Organempfängers gegen das verpflanzte Organ, chronische Graft-versus-Host-Erkrankungen und entzündliche Gefäßerkrankungen sind.

15

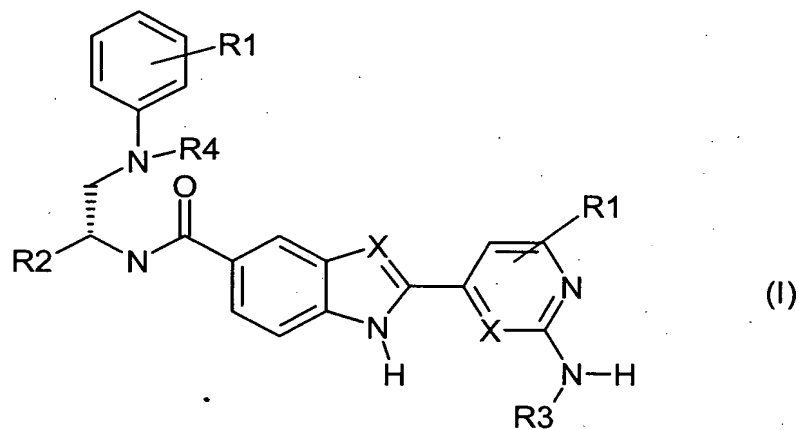
20

25

30

Indol- oder Benzimidazolderivate zur Modulation der I κ B-Kinase

5 Verbindungen der Formel I



eignen sich zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität von I κ B-Kinase beteiligt ist.